

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

MATHEUS LIMA CYPRIANO

Efeitos da terapia de reposição com testosterona e do chá mate (*Ilex paraguariensis*) nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox da saliva de ratos orquiectomizados

**Araçatuba
2021**

MATHEUS LIMA CYPRIANO

Efeitos da terapia de reposição com testosterona e do chá mate (*Ilex paraguariensis*) nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox da saliva de ratos orquiectomizados

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

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

Coorientadora: Prof.^a Ass. Dr.^a Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune

**Araçatuba
2021**

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

C996e Cypriano, Matheus Lima.
Efeitos da terapia de reposição com testosterona e do chá mate (*Ilex paraguariensis*) nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox da saliva de ratos orquiectomizados / Matheus Lima Cypriano. - Araçatuba, 2021
41 f. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto
Coorientadora: Profa. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune

1. Saliva 2. Glândulas salivares 3. Orquiectomia
4. Terapia de reposição hormonal 5. Testosterona
I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

A Júlia Peres, minha esposa, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho. Sem você isso não seria possível.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho. Principalmente aos alunos de iniciação científica e ao meu orientador professor Antonio.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do Diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara e do Vice-Diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Ao Prof. Ass. Dr. Antonio Hernandes Chaves Neto, pela atenção e apoio durante o processo de definição e orientação.

A Profa. Ass. Dra. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, pela atenção durante o processo de coorientação.

CAPES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
– Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

CYPRIANO, M. L. **Efeitos da terapia de reposição com testosterona e do chá mate (*Ilex paraguariensis*) nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox da saliva de ratos orquiectomizados. 2021.** 41 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

Apesar dos efeitos já conhecidos da testosterona (T) e do chá mate (CM) [*Ilex paraguariensis*] no estado redox de diversos tecidos biológicos, pouco se sabe a respeito de seus efeitos na saliva. O objetivo foi avaliar os efeitos da terapia de reposição com testosterona (TRT) e do CM nos parâmetros bioquímicos, funcionais e redox da saliva de ratos orquiectomizados. Sessenta ratos Wistar (3 meses de idade) foram castrados bilateralmente ou sofreram cirurgia fictícia (SHAM) e distribuídos aleatoriamente em cinco grupos: SHAM, OQX, UT (castrados que receberam injeção única de undecanoato de testosterona 100 mg/kg, CM (castrados que receberam CM 20 mg/kg, via gavagem intragástrica, diariamente) e UT+CM. Todos os tratamentos começaram 4 semanas após a castração e duraram 4 semanas. Ao final do tratamento, a secreção salivar foi estimulada por pilocarpina para determinação da taxa de fluxo salivar (TFS), pH, capacidade tamponante (CTS), além da análise da composição bioquímica pela mensuração da proteína total (PT), amilase (AMI), eletrólitos e biomarcadores de estresse oxidativo. TFS, CTS, cálcio, fósforo, cloreto, capacidade antioxidante total (CAT), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína carbonilada (PC) aumentaram com a OQX, enquanto o conteúdo de PT e atividade da AMI na saliva decaíram no grupo OQX. Já o pH, sódio e potássio salivar não foram alterados. A administração de CM aumentou a TFS, cálcio, fósforo, cloreto, CAT e PC. Por outro lado, o grupo CM sofreu redução da PT, enquanto o pH, CTS, AMI, sódio, potássio e TBARS não sofreram nenhuma alteração em relação ao grupo SHAM. Os grupos UT e UT+CM não sofreram qualquer tipo de alteração em relação ao SHAM. TRT com UT restaurou os parâmetros bioquímicos, funcionais e redox da saliva em ratos castrados. CM não teve um efeito semelhante à T na função da glândula salivar, no entanto, pode ser considerada uma ferramenta para aliviar o estresse oxidativo salivar induzido pela OQX.

Palavras-chave: Saliva. Glândulas salivares. Orquiectomia. Terapia de Reposição Hormonal. Testosterona.

CYPRIANO, M. L. **Effects of testosterone replacement therapy and mate tea (*Ilex paraguariensis*) on biochemical, functional and redox parameters of saliva in orchiectomized rats.** 2021. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

Despite the known effects of testosterone (T) and mate tea (MT) on the redox state of different biological tissues, little is known about their effects on saliva. The objective was to evaluate the effects of testosterone replacement therapy (TRT) and MT [*Ilex paraguariensis*] on biochemical, functional, and redox parameters of saliva in orchiectomized rats (ORX). Sixty young adult male Wistar rats (3 months old) were either castrated bilaterally or underwent fictitious surgery (SHAM) and were distributed into 5 groups: SHAM, ORX, TU (castrated rats that received a single intramuscular injection of testosterone undecanoate 100 mg/kg body weight (BW), MT (castrated rats that received MT 20 mg/kg BW, via intragastric gavage, daily) and TU+MT. All treatments started 4 weeks after castration and lasted 4 weeks. At the end of treatment, pilocarpine-induced salivary secretion was collected for analyzing of salivary flow rate (SFR) and biochemistry composition by determination of total protein (TP), amylase (AMY), electrolyte and biomarkers of oxidative stress. TFS, salivary buffering capacity (CTS), calcium, phosphorus, chloride, total antioxidant capacity (CAT), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyl (PC) increased with ORX. While the PT content and AMI activity in saliva decreased in the ORX group. On the other hand, salivary pH, sodium and potassium were not altered. MT administration increased TFS, calcium, phosphorus, chloride, CAT and PC. On the other hand, the MT group suffered a reduction in PT, while the pH, CTS, AMI, sodium, potassium and TBARS did not change in relation to the SHAM group. The TU and TU+MT groups did not suffer any changes in relation to SHAM. TRT with long-acting TU restored the biochemical, functional, and redox parameters of saliva in orchiectomized rats. MT did not have a testosterone-like effect on salivary gland function, however, it could be considered a tool to alleviate the salivary oxidative stress induced by orchiectomy.

Keywords: Saliva. Salivary Glands. Orchiectomy. Hormone Replacement Therapy. Testosterone.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Efeitos da OQX, UT e CM no peso corporal inicial e final, concentrações plasmáticas de T, peso relativo da próstata, PA, SM e SL, ingestão de ração e água de ratos Wistar	20
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Efeitos da OQX, UT e CM na taxa de fluxo salivar e nos parâmetros bioquímicos salivares. TFS (A), pH (B), CTS (C), concentração de PT (D) e atividade da AMI (E) de ratos Wistar22
- Figura 2 – Efeitos da OQX, UT e CM nos eletrólitos salivares. Cálcio (A), fósforo (B), cloreto (C), sódio (D) e potássio (E) salivar de ratos Wistar 23
- Figura 3 – Efeitos da OQX, UT e CM na capacidade antioxidante total da saliva e biomarcadores de estresse oxidativo. Capacidade antioxidante total salivar (A), TBARs salivar (B) e PC salivar (C) de ratos Wistar24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMI	Amilase
CAT	Capacidade antioxidante total
Sham	Cirurgia placebo
CM	Chá mate
dL	Decilitro
FRAP	Ensaio de poder redutor férrico / antioxidante
HPB	Hiperplasia benigna de próstata
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
L	Litro
μmol	Micromol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mmol	Milimol
min	Minuto
ng	Nanograma
OQX	Orquiectomia
PA	Parótida
PC	Proteína carbonilada
PT	Proteína total
kg	Quilograma
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do conhecimento tradicional associado
SL	Sublingual
SM	Submandibular
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TFS	Taxa de fluxo salivar
TRT	Terapia de reposição com testosterona
T	Testosterona
TGC	Túbulo granulares convoluto
U	Unidade de atividade enzimática

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1	Animais e tratamento	15
2.2	Orquiectomia.....	16
2.3	Preparo do chá mate	16
2.4	Coleta de saliva e determinação da taxa fluxo salivar	17
2.5	Coleta de sangue, glândulas salivares e próstata.....	17
2.6	Ensaio quimioluminescente de testosterona plasmática	18
2.7	Análises bioquímicas salivares	18
2.8	Análises estatísticas	19
3	RESULTADOS	20
3.1	Níveis plasmáticos de testosterona, massa relativa da próstata, massa corporal inicial, final, ingestão ração e água, massa relativa das glândulas PA, SM e SL	20
3.2	Taxa de fluxo salivar e parâmetros bioquímicos salivares.....	21
3.3	Eletrólitos salivares	22
3.4	Estado redox salivar	24
4	DISCUSSÃO	26
5	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	33
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	40
	ANEXO B – COMPROVANTE DE CADASTRO NO SISGEN	41

1 INTRODUÇÃO

Testosterona (T) é um hormônio andrógeno com predominância em homens. Ele desempenha efeitos importantes nas estruturas e função ligadas ao sistema reprodutivo, na manutenção da força muscular e disposição (TYAGI; SCORDO; YOON; LIPORACE *et al.*, 2017). Em homens, a redução na concentração sérica de T está associada com maior prevalência e agressividade de doença periodontal e inflamação gengival (DALTABAN; SAYGUN; BOLU, 2006; FAMILI; CAULEY; GREENSPAN, 2007; SALERNO; CASCIO; BERTOZZI; SESSA *et al.*, 2018; STEFFENS; WANG; STARR; SPOLIDORIO *et al.*, 2015). A maioria das pesquisas, no campo da saúde bucal dão maior enfoque aos efeitos da T sobre o tecido periodontal do que às glândulas salivares, mesmo exercendo estas um papel de grande importância na homeostase da boca.

A saliva é composta de 99% água e 1% sólidos, principalmente proteínas e sais (PEDERSEN; SORENSEN; PROCTOR; CARPENTER *et al.*, 2018). A saliva é uma mistura de eletrólitos e proteínas com diferentes funções biológicas na digestão, atividades antimicrobianas, paladar, proteção, lubrificação e manutenção da saúde bucal e geral (ILEA; ANDREI; FEURDEAN; BABTAN *et al.*, 2019). As glândulas parótida (PA), submandibular (SM) e sublingual (SL) sintetizam cerca de 90% de saliva. Elas captam e metabolizam os andrógenos (CEFALU; PARDRIDGE; CHAUDHURI; JUDD, 1986; LI; YAO; LIANG; WANG *et al.*, 2005; LOOD; AARDAL-ERIKSSON; WEBE; AHLNER *et al.*, 2018), exercendo relevante dimorfismo sexual entre as glândulas de machos e fêmeas, em particular nas células do tubulo granular convoluto (TGC), que são mais espessas e numerosas em machos, estrutura essa exclusiva em ratos. Em humanos, esse dimorfismo sexual ocorre em células do ducto estriado (PROCTOR, 2016). As células do TGC sintetizam fatores de crescimento epidermal e neural após atividade da T, formando sua estrutura morfológica e consequentemente suas funções ligadas a troca iônica no lúmen ductal (PORCHERI; MITSIADIS, 2019), já a ausência de T causa significativa redução no volume de ácinos e ductos, além de significativo aumento do tecido conjuntivo (JEZEK; BANEK; BANEK, 1996).

Estudo *ex vivo* mostrou que a castração reduz a liberação de amilase (AMI) da glândula PA em roedores (BUSCH; STERIN-BORDA; BORDA, 2006) e que essa função é restabelecida com a administração exógena de T (BUSCH; BORDA, 2003).

Na glândula SM de roedores machos, a castração causa extensa involução das células do TGC por meio da conversão em células do ducto estriado, levando ao fenótipo de glândulas do sexo oposto, situação que também se normalizou após a administração exógena de T (ADTHAPANYAWANICH; YAMAMOTO; WAKAYAMA; NAKATA *et al.*, 2013). Apesar das evidências, não está claro se os baixos níveis plasmáticos de T podem afetar a taxa de fluxo salivar (TFS) a composição bioquímica, função e estado redox da saliva.

Embora estudos pioneiros tenham mostrado alguns efeitos da terapia de reposição com testosterona (TRT) sobre as glândulas salivares, em seus componentes e funções, essa relação ainda não está bem definida. Segundo FELIX-PATRÍCIO; MIRANDA; MEDEIROS; GALLO *et al.* (2017), a próstata sofre devido a altas doses de T, por meio da redução da atividade do sistema de defesa antioxidante enzimático, resultando em aumento da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador clássico de dano oxidativo lipídico (SHOIEB; ESMAT; KHALIFA; ABDEL-NAIM, 2018; WU; GU; LI, 2017). Em condições de diabetes e obesidade, a capacidade antioxidante total (CAT) diminui, enquanto o nível de proteína carbonilada (PC) aumenta, um marcador de dano oxidativo às proteínas (BIGAGLI; LODOVICI, 2019; CHAINY; SAHOO, 2020). A TRT com implantes subcutâneos de T também interferem no estado redox da glândula SM e próstata de ratos, como evidenciado pela maior presença de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, um marcador de dano oxidativo ao DNA nesses tecidos. Esses resultados em ratos sugerem a existência de semelhanças que vão além dos parâmetros morfológicos e fisiológicos entre a próstata e as glândulas salivares (WHELAN; LU; FRIDMAN; WOLF *et al.*, 2010). No entanto, a ação da TRT pode diferir muito entre os mesmos tecidos, dependendo dos fármacos e dos protocolos de administração (dose e frequência) utilizados, sendo necessário mais estudos para compreender a ação da TRT no estado redox das glândulas salivares.

Nas últimas décadas, muitos estudos tem relatado os efeitos de substâncias naturais, como os fitoterápicos em vários órgãos (TILBURT; KAPTCHUK, 2008). Foi descoberto que ratos deficientes de T induzido por OQX, que receberam tratamento com ervas mostraram aumento da densidade mineral óssea [*Eurycoma longifolia*] (JAYUSMAN; MOHAMED; ALIAS; DOM *et al.*, 2018), além da melhora da função erétil [*Cistanche deserticola*] (GU; XIONG; ZHUANG; ZHANG *et al.*, 2016). Além disso, o tratamento com ervas retardou o declínio da função do músculo

esquelético, além da inibição do apoptose da glândula lacrimal [*Buddleja officinalis Maxim.*] (PENG; YAO; WU; TAN *et al.*, 2010) e diminuição da hiperplasia prostática benigna (HPB) [*Smilax china L.*] (CHEN; XIONG; SONG; HAN *et al.*, 2012), [*Cynanchum wilfordii*] (LEE; SHIN; CHOI; JO *et al.*, 2017), [*Glycyrrhiza glabra*] (ZAMANSOLTANI; NASSIRI-ASL; SAROOKHANI; JAHANI-HASHEMI *et al.*, 2009).

O chá mate (CM) é uma bebida típica consumida em vários países da América Latina. É preparado por infusão de *Ilex paraguariensis* (DE OLIVEIRA; SAMPAIO; PINTO; CATHARINO *et al.*, 2017; HECK; DE MEJIA, 2007), e apresenta um perfil nutricional saudável, contendo vitaminas, minerais, aminoácidos, vários polifenóis, principalmente derivado de ácido clorogênico e alguns flavonóides (rutina e quercetina) (CONFORTI; GALLO; SARAIVI, 2012; DE OLIVEIRA; SAMPAIO; PINTO; CATHARINO *et al.*, 2017). Na dieta da população brasileira, o consumo de CM é um dos principais contribuintes para a capacidade antioxidante (TORRES; FARAH, 2017). Alguns dos efeitos conhecidos de sua ingestão são suas ações antimicrobiana, antioxidante, antiobesidade, antidiabética e proteção cardiovascular (GAN; ZHANG; WANG; CORKE, 2018). Verificou-se também que a ingestão diária de CM foi capaz de modular o estresse oxidativo em ratas na perimenopausa, minimizando o dano oxidativo nos eritrócitos e no fígado (PEREIRA; TIRAPELI; CHAVES-NETO; DA SILVA BRASILINO *et al.*, 2017), além de diminuir a perda óssea (PEREIRA; STRINGHETTA-GARCIA; DA SILVA XAVIER; TIRAPELI *et al.*, 2017). Em ratos machos, seu consumo também aumentou a defesa antioxidante e melhorou a formação óssea na cavidade dentária após a extração do incisivo superior (BRASILINO; STRINGHETTA-GARCIA; PEREIRA; PEREIRA *et al.*, 2018). Devido à sua composição e aos comprovados efeitos do CM atuando contra o estresse oxidativo em diversos tecidos, aliado ao amplo consumo que este produto apresenta na América Latina, surge a necessidade de verificar seus efeitos antioxidantes em componentes salivares, uma vez que a saliva exerce um papel fundamental na saúde bucal.

Assim, o objetivo da pesquisa foi analisar os efeitos da TRT e CM sobre os parâmetros bioquímicos, funcionais e redox da saliva de ratos orquiectomizados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e tratamento

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 455-2019, anexo A). O total de sessenta ratos Wistar machos adultos jovens (*Rattus norvegicus albinus*, 3 meses de idade) foram alojados em uma sala com temperatura controlada (22 ± 2 °C) sob um ciclo claro/escuro de 12/12 h. Os animais tiveram livre acesso a comida e água. A massa corporal, ingestão de água e ração foram medidas duas vezes por semana. Após o período de aclimação (sete dias), os animais foram estratificados por peso corporal e, em seguida, distribuídos aleatoriamente na linha de base em cinco grupos, da seguinte forma (n = 12 ratos/grupo): cirurgia placebo (SHAM); orquiectomizados (OQX) que receberam tratamento placebo via gavagem intragástrica e intramuscular (TEK; BALLI; CIMEN; EFESoy *et al.*, 2010); UT, consistia em ratos castrados que receberam uma única injeção intramuscular de undecanoato de testosterona 100 mg/kg (Nebido®, Bayer Pharma AG, Alemanha), juntamente com o tratamento placebo via gavagem intragástrica (CALLIES; KOLLENKIRCHEN; VON ZUR MUHLEN; TOMASZEWSKI *et al.*, 2003; DE PAIVA GONCALVES; ORTEGA; STEFFENS; SPOLIDORIO *et al.*, 2018; HUH; CHUNG; HONG; RYU *et al.*, 2018; TEK; BALLI; CIMEN; EFESoy *et al.*, 2010; WANG; XU; XIA; ZHONG *et al.*, 2015). O grupo CM foi composto por ratos castrados que receberam diariamente por gavagem intragástrica 20 mg/kg de CM (BRASILINO; STRINGHETTA-GARCIA; PEREIRA; PEREIRA *et al.*, 2018), além do tratamento placebo via injeção intramuscular em dose única. Já o grupo UT+CM recebeu concomitantemente os dois tratamentos com CM diariamente e dose única de UT, nas doses já citadas. Os tratamentos placebos com solução salina via gavagem intragástrica foi realizado para simular o mesmo estresse dos animais que receberam tratamento com CM. O tratamento placebo por injeção intramuscular de solução salina foi para simular o mesmo estresse da aplicação hormonal. Ambos foram administrados no mesmo volume de seus respectivos pares, além disso, todos os tratamentos foram iniciados exatamente 4 semanas após a cirurgia de castração (4 meses de idade) e se encerram após 4 semanas de tratamento (5 meses de idade). Quatro semanas após a orquiectomia é tempo suficiente para reduzir as concentrações plasmáticas de T (BUSCH; BORDA, 2003;

BUSCH; STERIN-BORDA; BORDA, 2006; DE PAIVA GONCALVES; ORTEGA; STEFFENS; SPOLIDORIO *et al.*, 2018) e para induzir alterações morfofisiológicas nas glândulas salivares em roedores (CHEN; ZOU; ZHANG; XU *et al.*, 2016).

2.2 Orquiectomia

Todos os ratos foram anestesiados com uma mistura de 75 mg/kg de cloridrato de cetamina (Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil) e 10 mg/kg cloridrato de xilazina (Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil), via IM. A seguir foi realizada a antisepsia com iodeto de polivinilpirrolidona. Em todos os grupos castrados, ambos os testículos foram removidos cirurgicamente através de uma incisão longitudinal feita no escroto, e as feridas cirúrgicas foram suturadas com fio de seda 4.0. Os ratos do grupo SHAM foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, exceto que os testículos foram preservados apenas para que esses animais experimentassem o mesmo estresse cirúrgico (DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA PUTTINI; SILVA GOMES-FERREIRA; PALIN *et al.*, 2019).

No final da cirurgia, para prevenção de infecção os animais receberam injeção intramuscular de preparo combinação de benzilpenicilina e sais de estreptomicina (0,2 mL/animal, Pentabiótico, Forte Dodge®, Campinas, SP, Brasil) e para o alívio da dor pós-operatória foi administrado injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório cetoprofeno (5 mg/kg, Ketoflex, Mundo Animal, SP, Brasil). Os ratos se recuperaram por 4 dias após a cirurgia.

2.3 Preparo do chá mate

O CM foi preparado pela dissolução do pó instantâneo (Leão Jr.®, Curitiba, PR, Brasil) (lote único, número: 183477) em água pura na concentração de 0,05 g/mL à temperatura ambiente, conforme a literatura (BRASILINO; STRINGHETTA-GARCIA; PEREIRA; PEREIRA *et al.*, 2018). O teor de polifenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), usando ácido gálico como padrão. A CAT foi avaliada pelo ensaio de poder redutor férrico / antioxidante (FRAP), conforme descrito por (BENZIE; STRAIN, 1996). Uma série de soluções de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ foi usada para a construção de uma curva de calibração. O poder redutor foi expresso em Fe^{2+} mmol/g CM pó. A CAT

do CM foi de $3,11 \pm 0,07 \text{ Fe}^{2+} \text{ mmol/g}$ de pó, enquanto o teor de polifenol total foi equivalente a $174,94 \pm 2,23 \text{ mg}$ de ácido gálico/g de pó. A pesquisa foi registrada no SISGEN nº. AD6CD28.

2.4 Coleta de saliva e determinação da taxa de fluxo salivar

Ao final do período de tratamento os animais foram anestesiados, conforme descrito anteriormente, e o fluxo salivar foi estimulado com nitrato de pilocarpina (5 mg/kg , por via intraperitoneal, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os ratos foram colocados em uma prancha inclinada, e toda a saliva foi 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 os frascos cheios e vazios, considerando a densidade da saliva como 1 g/mL (ELIAS; DOS SANTOS; SASSAKI; DELBEM *et al.*, 2006). A TFS foi calculada 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 massa corpórea. A saliva foi fracionada e armazenada (-80°C) até o dia da análise laboratorial. O pH e a capacidade tamponante salivar (CTS) foram avaliados na saliva fresca. Imediatamente após a coleta, o pH salivar foi medido em amostras de saliva com um eletrodo específico (Analyzer, São Paulo, SP, Brasil) conectado a um pHmetro (Thermo Fischer, Orion 720A, MA, EUA), previamente calibrado. A CTS foi calculada pelo método titulométrico, de acordo com o volume de ácido láctico ($0,1 \text{ mol/L}$) utilizado para reduzir o pH salivar para valor abaixo de 4,0 e foi expresso em mL de ácido láctico (PICCO; COSTA; DELBEM; SASSAKI *et al.*, 2012).

2.5 Coleta de sangue, glândulas salivares e próstata

Após a coleta de saliva, os animais foram eutanasiados por exsanguinação por punção cardíaca, sempre pela manhã (9h às 11h) para minimizar os ritmos circadianos. Amostras de sangue coletadas durante a punção cardíaca foram processadas para obtenção do plasma por meio da centrifugação por 10 minutos a 4°C e na sequência os plasmas foram armazenados à -80°C até a dosagem da testosterona plasmática. Imediatamente após a eutanásia, procedeu-se a exérese das glândulas salivares PA, SM e SL de ambos os lados. Após a limpeza, as glândulas

foram secas e pesadas. A eficácia do OQX foi confirmada pela avaliação da massa relativa da próstata no final do experimento.

2.6 Ensaio quimioluminescente de testosterona plasmática

Os níveis plasmáticos totais de T foram medidos usando imunoensaio por tecnologia de quimioluminescência de micropartículas com um analisador de imunologia Architect i1000 (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, EUA). Os dados foram relatados em ng/dL.

2.7 Análises bioquímicas salivares

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 microplaca (PowerWave 340, BioTek, EUA). Todos os valores foram determinados em amostras em duplicadas e padronizadas pelo conteúdo de proteína total (PT). A normalização por PT tornou possível avaliar diferenças na proporção de analitos bioquímicos presentes na saliva.

O conteúdo 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 amido-iodo conforme descrito anteriormente em detalhes (NAGY; BARTA; VARGA; ZELLES, 2001) usando um 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 de ensaio descritas. As atividades AMI foram avaliadas e normalizadas pela quantidade de PT.

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.

A CAT da saliva foi determinada usando o ensaio FRAP (BENZIE; STRAIN, 1996). Com base na redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} , que é quelado por 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe^{2+} -TPTZ com uma absorbância máxima a 593 nm. Os resultados foram calculados usando uma curva padrão construída com

diferentes concentrações de soluções de FeSO_4 e foram expressos em mmol/L. Os resultados foram avaliados e normalizados pela quantidade de PT.

A peroxidação lipídica foi realizada pela dosagem de TBARs (BUEGE; AUST, 1978). O sobrenadante foi agitado suavemente com a mistura de reação contendo 15% (m/v) de ácido tricloroacético, 0,67% (m/v) de ácido tiobarbitúrico e 0,25 mol/L de HCl. As amostras foram incubadas em banho-maria a 95 ° C por 45 minutos e a seguir resfriadas em gelo. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 1000 x *g* por 10 minutos. Após centrifugação, o TBARs no sobrenadante foi determinado a 532 nm em um leitor de microplaca (Biotek Powerwave 340, EUA). A quantidade de aldeídos formados foi calculada pelo seu coeficiente de extinção ($\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram avaliados e normalizados pela quantidade de PT. O conteúdo de PC foi quantificado pelo método alcalino de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (MESQUITA; OLIVEIRA; BENTO; GERALDO *et al.*, 2014). O DNPH (10 mmol/L em 0,5 mol/L de H_3PO_4) foi adicionado ao sobrenadante e a mistura foi incubada por 10 min em temperatura ambiente. NaOH (6 mol/L) foi então adicionado. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 450 nm contra um branco em que a solução de proteína foi substituída por um volume igual de solução tampão. O conteúdo de carbonil foi calculado, usando o coeficiente de absorção molar ($\epsilon_{450} = 22308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram avaliados e normalizados pela quantidade de PT.

2.8 Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados em duplicata, expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados quanto à normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Utilizou-se também a análise de variância *one-way* (ANOVA) seguida do *pos hoc* teste de Tukey. Para todas as análises, os níveis de probabilidade $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 Níveis plasmáticos de testosterona, massa relativa da próstata, massa corporal inicial, final, ingestão ração e água, massa relativa das glândulas PA, SM e SL

A massa corpórea inicial antes da orquiectomia foi similar entre todos os grupos (3 meses de idade). Ao final da quarta semana após cirurgia de orquiectomia (4 meses de idade), o protocolo experimental seguiu-se por mais quatro semanas de tratamento (5 meses de idade), no qual todos os grupos experimentais ganharam massa corpórea durante o período experimental, contudo, a massa corpórea final foi menor no grupo OQX ($p < 0,0001$), UT ($p < 0,05$), CM ($p < 0,01$) e UT+CM ($p < 0,05$) comparados ao grupo SHAM (tabela 1). Os níveis plasmáticos de T foram indetectáveis nos grupos OQX e CM. A TRT normalizou os níveis plasmáticos de T nos grupos UT e UT+CM. A massa relativa da próstata diminuiu drasticamente nos grupos OQX ($p < 0,0001$) e CM ($p < 0,0001$) comparados ao grupo SHAM, enquanto os grupos UT ($p < 0,0001$) e UT+CM ($p < 0,0001$) apresentaram aumento significativo da massa relativa da próstata comparado ao grupo SHAM. A TRT e o CM não tiveram influência na massa relativa das glândulas PA e SL. A massa relativa da glândula SM foi similar entre os grupos SHAM e OQX, enquanto os grupos UT ($p < 0,01$), CM ($p < 0,001$) e UT+CM ($p < 0,001$) apresentaram aumento na massa relativa da glândula SM comparados ao grupo SHAM. A ingestão de água foi menor nos grupos OQX ($p < 0,0001$), CM ($p < 0,0001$) e UT+CM ($p < 0,001$) em relação ao grupo SHAM. Apesar da TRT e do tratamento com CM, a ingestão de comida diminuiu em todos os grupos experimentais em comparação ao grupo SHAM (tabela 1).

Tabela 1 - Efeitos da OQX, UT e CM na massa corporal inicial e final, concentrações plasmáticas de T, massa relativa da próstata, PA, SM e SL, ingestão de ração e água de ratos Wistar

(continua)

Parâmetros	SHAM	OQX	UT	CM	UT+CM
Massa corpórea inicial (g)	420,4 ± 16,71a	426,7 ± 24,62a	420,0 ± 17,58a	421,7 ± 30,85a	420,4 ± 15,73a

Tabela 1 - Efeitos da OQX, UT e CM na massa corporal inicial e final, níveis plasmáticos de T, massa relativa da próstata, PA, SM e SL, ingestão de ração e água de ratos Wistar

(conclusão)

Parâmetros	SHAM	OQX	UT	CM	UT+CM
Massa corpórea final (g)	572,9 ± 37,69a	495,0 ± 36,87b	527,5 ± 22,11b	496,7 ± 42,12b	518,3 ± 17,49b
Níveis plasmáticos de T (ng/dL)	378,6 ± 73,23a	<7,0 ± 0,0b	353,0 ± 76,1a	<7,0 ± 0,0b	386,8 ± 53,09a
Massa relativa da próstata (g/kg)	2,403 ± 0,386a	0,3700 ± 0,0479b	3,058 ± 0,494c	0,357 ± 0,0585b	3,276 ± 0,344c
Massa relativa da PA (g/kg)	0,83 ± 0,11a	0,81 ± 0,14a	0,75 ± 0,08a	0,80 ± 0,16a	0,80 ± 0,12a
Massa relativa da SM (g/kg)	0,75 ± 0,12a	0,80 ± 0,07b	0,86 ± 0,10b	0,89 ± 0,13b	0,90 ± 0,11b
Massa relativa da SL (g/kg)	0,23 ± 0,03a	0,24 ± 0,03a	0,24 ± 0,03a	0,26 ± 0,06a	0,25 ± 0,03a
Ingestão de água (L/semana/grupo)	1,71 ± 0,087a	1,48 ± 0,034b	1,7 ± 0,1045a	1,46 ± 0,066b	1,49 ± 0,093b
Ingestão de ração (kg/semana/grupo)	898,5 ± 30,45a	793,2 ± 40,9b	814,1 ± 22,10b	775,3 ± 44,45b	827,7 ± 14,86b

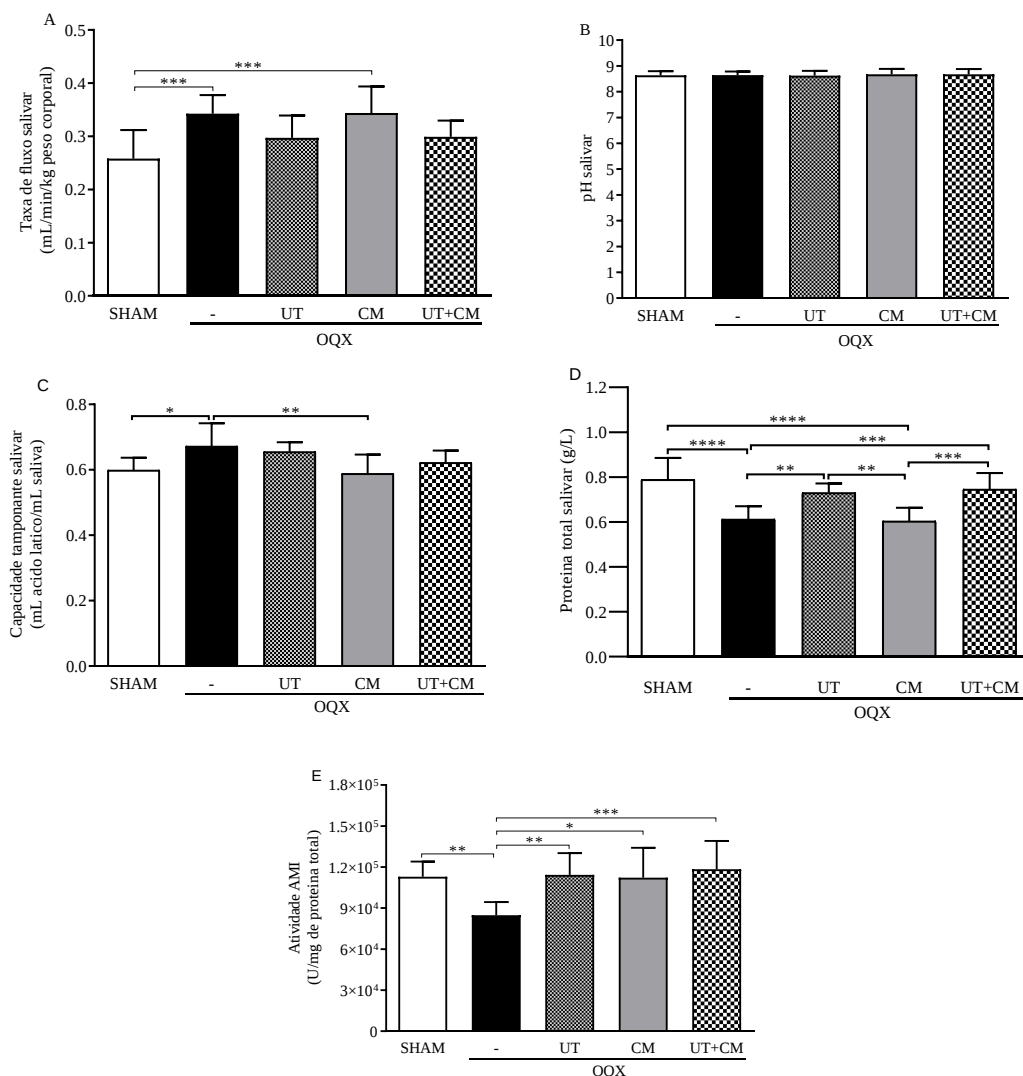
(Fonte: elaborada pelo autor 2021)

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão, n = 12 ratos/grupo. Os valores seguidos por diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatística. Os resultados foram analisados por análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido do *pos hoc* teste de Tukey. Para todos os testes, os níveis de probabilidade $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.2 Taxa de fluxo salivar e parâmetros bioquímicos salivares

A TFS aumentou nos grupos OQX ($p < 0,001$) e CM ($p < 0,001$) comparado ao grupo SHAM (Fig. 1A). Os valores de pH foram similares entre todos os grupos (Fig. 1B). A CTS aumentou apenas no grupo OQX em comparação com ao SHAM ($p < 0,05$) (Fig. 1C). A PT salivar foi menor nos grupos OQX ($p < 0,01$) e CM ($p < 0,01$) comparados ao SHAM (Fig. 1D). A atividade de AMI salivar reduziu apenas nos grupos OQX em relação ao SHAM ($p < 0,01$) (Fig. 1D). Os tratamentos com UT e UT+CM foram eficientes em restaurar os parâmetros bioquímicos e funcionais da saliva aos parâmetros do grupo SHAM, enquanto o CM restaurou apenas a AMI.

Figura 1 - Efeitos da OQX, UT e CM na taxa de fluxo salivar e nos parâmetros bioquímicos salivares. TFS (A), pH (B), CTS (C), concentração de PT (D) e atividade da AMI (E) de ratos wistar



(Fonte: elaborada pelo autor 2021)

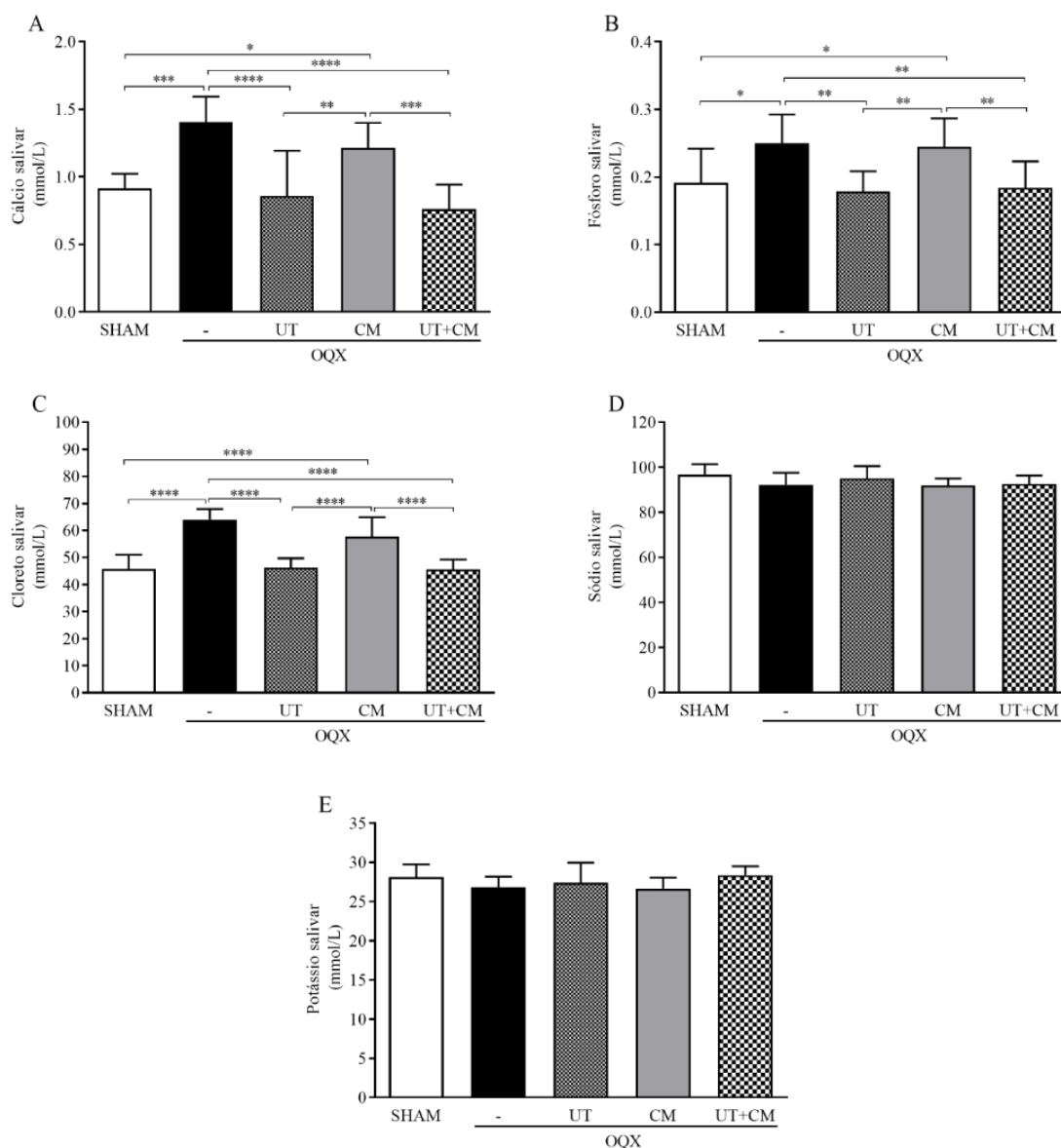
Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 12$ ratos/grupo. Os resultados foram submetidos a análise de variância *one-way* (ANOVA) seguida do *pos hoc* teste de Tukey. Para todas os testes, os níveis de probabilidade $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Abreviaturas: CM, chá mate; TFS, taxa de fluxo salivar; CTS, capacidade tampão salivar; PT, proteína total; AMI, α -amilase; OQX, orquiectomia; UT, undecanoato de testosterona.

3.3 Eletrólitos salivares

O cálcio salivar foi maior nos grupos OQX ($p < 0,001$) e CM ($p < 0,05$) comparados ao SHAM (Fig. 2A). O fósforo salivar também foi maior nos grupos OQX ($p < 0,05$) e CM ($p < 0,05$) comparados ao SHAM (Fig. 2B). Similarmente, os valores de cloreto salivar aumentaram nos grupos OQX ($p < 0,0001$) e CM ($p < 0,0001$) em

relação ao SHAM (Fig. 2C). O sódio (Fig. 2D) e potássio salivar (Fig. 2E) foram similares entre todos os grupos experimentais. Apenas o UT e UT+CM foram eficientes em reestabelecer os eletrólitos salivares aos níveis do grupo SHAM.

Figura 2 - Efeitos da OQX, UT e CM nos eletrólitos salivares. Cálcio (A), fósforo (B), cloreto (C), sódio (D) e potássio (E) salivar de ratos Wistar



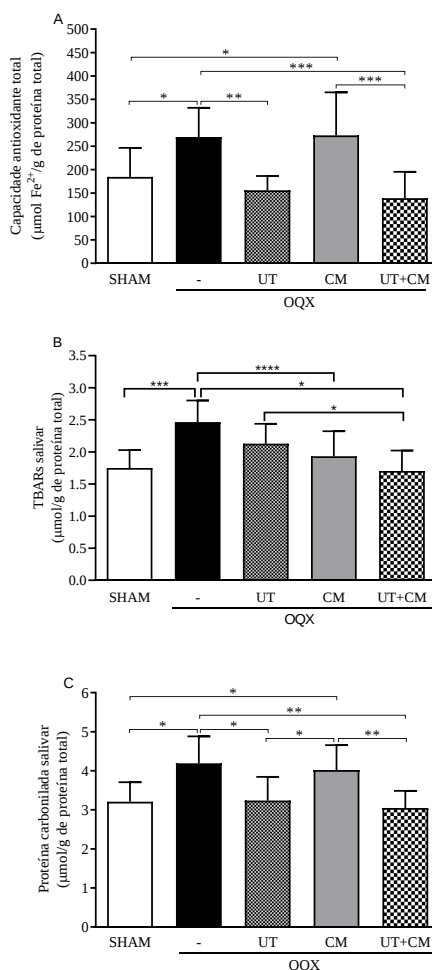
(Fonte: elaborada pelo autor 2021)

Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, $n = 12$ ratos/grupo. Os resultados foram submetidos a análise de variância *one-way* (ANOVA) seguida do *pos hoc* teste de Tukey. Para todas os testes, os níveis de probabilidade $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Abreviaturas: CM, chá mate; OQX, orquiectomia; UT undecanoato de testosterona.

3.4 Estado redox salivar

A CAT foi maior nos grupos OQX ($p < 0,05$) e CM ($p < 0,05$) comparados ao SHAM (Fig. 3A). O dano oxidativo aos lipídeos (TBARs) aumentou apenas no grupo OQX ($p < 0,001$) em relação ao SHAM (Fig. 3B). A PC, um marcador de danos oxidativo as proteínas, também foi maior nos grupos OQX ($p < 0,05$) e CM ($p < 0,05$) comparados ao SHAM (Fig. 3C). O UT e UT+CM foram eficientes em restaurar os parâmetros da CAT, TBARs e PC a níveis similares ao grupo SHAM, enquanto o CM restaurou apenas o TBARs.

Figura 3 - Efeitos da OQX, UT e CM na capacidade antioxidante total da saliva e biomarcadores de estresse oxidativo. Capacidade antioxidante total salivar (A), TBARs salivar (B) e PC salivar (C) de ratos Wistar



(Fonte: elaborada pelo autor 2021)

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 12$ ratos/grupo. Os resultados foram submetidos a análise de variância *one-way* (ANOVA) seguida do *pos hoc* teste de Tukey. Para todas os testes, os níveis de probabilidade $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Abreviaturas: CM, chá mate; CAT, capacidade antioxidante total; TBARs, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PC, proteína carbonilada; OQX, orquiectomia; UT, undecanoato de testosterona.

4 DISCUSSÃO

Ao final do período experimental, a castração aumentou a TFS, CTS, cálcio, fósforo e cloreto salivar, enquanto diminuiu a secreção de PT e AMI. A depleção de testosterona induzida por OQX também aumentou os biomarcadores de dano oxidativo salivar como evidenciado pelo conteúdo de TBARS, PC e também pela CAT. A TRT com UT de liberação prolongada foi eficaz em aumentar a T plasmática a níveis fisiológicos, bem como restaurar TFS, a composição bioquímica salivar através do conteúdo de cálcio, fósforo e cloreto salivar, além dos parâmetros redox como a CAT e o conteúdo de PC. Contudo, a TRT ocasionou um aumento significativo da massa prostática em relação aos níveis fisiológicos. Já o tratamento com CM amenizou parcialmente as alterações salivares devido à deficiência androgênica induzida pela castração, como a CTS, atividade da AMI e o conteúdo de TBARS. Portanto, os resultados demonstraram que a TRT restabeleceu os parâmetros bioquímicos, funcionais e o estado redox em ratos orquiectomizados, todavia o aumento da massa da próstata em ambos os grupos submetidos a TRT com relação ao grupo SHAM deve ser considerado como um efeito adverso que exige atenção durante a TRT, por causa do risco de indução de câncer de próstata. Por sua vez, o tratamento com CM apresentou efeitos discretos com relação ao restabelecimento dos níveis de dano oxidativo lipídico e atividade da AMI em relação ao grupo SHAM. Apesar disso, o CM surge como uma opção terapêutica coadjuvante nos casos de homens com câncer sensível a androgênicos que foram submetidos a supressão androgênica, utilizando castração cirúrgica ou química. Os efeitos do tratamento do CM foram sobrepostos diante da associação com TRT, o que comprova as limitações desse composto natural em amenizar as alterações induzidas pela OQX.

Existem vários protocolos para TRT. O presente estudo utilizou o fármaco UT, em dose única de 100 mg/kg. A escolha desse protocolo se deu em função da farmacocinética do UT. Tem sido relatado na literatura que 100 mg/kg de UT é capaz de gerar níveis fisiológicos de T por um período mínimo de 4 semanas (CALLIES; KOLLENKIRCHEN; VON ZUR MUHLEN; TOMASZEWSKI *et al.*, 2003). Essa droga gera uma liberação mais lenta de T, evitando picos e vales, que por sua vez estão associados aos efeitos adversos da TRT (CALLIES; KOLLENKIRCHEN; VON ZUR MUHLEN; TOMASZEWSKI *et al.*, 2003).

O CM tem efeitos atribuídos aos seus compostos com alto teor de polifenóis, com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiobesidade (ARCARI; SANTOS; GAMBERO; RIBEIRO, 2013). Existem divergências entre as

doses a serem administradas de CM, porém, anteriormente nosso grupo mostrou que a dose de 20 mg/kg ajuda a reduzir o estresse oxidativo nos eritrócitos e fígado de ratas na perimenopausa (PEREIRA; TIRAPELI; CHAVES-NETO; DA SILVA BRASILINO *et al.*, 2017) e diminui a perda óssea (PEREIRA; STRINGHETTA-GARCIA; DA SILVA XAVIER; TIRAPELI *et al.*, 2017). Em ratos, a mesma dose também aumentou a defesa antioxidante e melhorou a formação óssea no alvéolo dentário após a extração do incisivo superior (BRASILINO; STRINGHETTA-GARCIA; PEREIRA; PEREIRA *et al.*, 2018).

A TRT é necessária em alguns casos de hipogonadismo, visto que o desenvolvimento e funcionamento de diversos tecidos é dependente da ação da T (KWONG; KRAKOWSKY; GROBER, 2019), contudo, a TRT pode causar efeitos adversos, dependendo do protocolo de terapia hormonal utilizado. Um trabalho com o mesmo protocolo do presente estudo identificou que 100 mg/kg de UT causou HPB e câncer testicular em ratos macho (FELIX-PATRICIO; MIRANDA; MEDEIROS; GALLO *et al.*, 2017). A literatura está repleta de trabalhos investigando a HPB, mas em sua grande maioria, essa patologia é gerada propositalmente por doses elevadas de T (AKANNI; ABIOLA; ADARAMOYE, 2017; CHEN; XIONG; SONG; HAN *et al.*, 2012). Com o objetivo de reduzir as complicações da TRT sobre a próstata, o tratamento com ervas pode ser usado para amenizar o desenvolvimento de HBP, conforme demonstrado após o tratamento com *Melandrium firmum* (LEE; SHIN; SEO; LEE *et al.*, 2012) e *Cynanchum wilfordii* (LEE; SHIN; CHOI; JO *et al.*, 2017). Porém, o protocolo de tratamento com CM escolhido não conseguiu mitigar o crescimento da próstata provocado pelo TRT.

As funções anabólicas da T em muitos tecidos já está muito bem documentada (CALLIES; KOLLENKIRCHEN; VON ZUR MUHLEN; TOMASZEWSKI *et al.*, 2003; CHRISTOU; CHRISTOU; MARKOZANNES; TSATSOULIS *et al.*, 2017). Também já está relatado na literatura que a cirurgia de castração causa redução da massa corporal, como consequência da diminuição da ingestão de ração e água (ASARIAN; GEARY, 2006; 2013; AXELL; MACLEAN; PLANT; HARCOURT *et al.*, 2006), assim como apresentado no presente estudo. Por sua vez, a TRT amenizou a perda de massa corporal, além de normalizar a ingestão de água, enquanto a ingestão de ração não se alterou. O período em que os animais ficaram sem T foi suficiente para causar catabolismo ósseo e muscular. É conhecido que esses tecidos constituem boa parte da massa corporal dos animais (KWONG; KRAKOWSKY; GROBER, 2019),

sendo o tempo do protocolo de TRT insuficiente no desenvolvimento dessas estruturas a parâmetros pré castração.

A castração não afetou as massas relativas das glândulas salivares. Contrariamente aos resultados encontrados no presente estudo, alguns trabalhos mostraram que a OQX reduz a massa absoluta da SM (MELVIN; HAMILL, 1987; SAWADA; NOUMURA, 1991), sendo essa discrepância justificada devido as diferenças no modelo experimental, uma vez que tais estudos castraram os ratos no período pós-natal, o que provavelmente comprometeu todo o desenvolvimento androgênico da glândula SM. Em ambos os estudos, a TRT aumentou a massa da SM próxima à dos animais controle intactos (MELVIN; HAMILL, 1987; SAWADA; NOUMURA, 1991), enquanto no presente estudo a massa relativa da SM dos grupos UT, CM e UT+CM foi maior em relação ao grupo SHAM, apesar da T plasmática estar dentro dos níveis fisiológicos. Como mostram os resultados do presente estudo, este modelo experimental é o primeiro a demonstrar que a castração seguida de TRT não afeta a massa relativa do PA e da SL. Esse resultado pode estar associado ao perfil de expressão dos receptores de andrógenos nas glândulas salivares. Até o momento, a distribuição e o controle da expressão do receptor foram bem caracterizados na glândula SM de humanos (LAINE; BLAUER; YLIKOMI; TUOHIMAA *et al.*, 1993) e ratos (LI; YAO; LIANG; WANG *et al.*, 2005). Na PA de humanos, a imunorreatividade do receptor de andrógeno se mostrou mais evidente nas células acinares do que nas ductais, enquanto nas células SM a intensidade da imunorreatividade foi maior nas células ductais (LAINE; BLAUER; YLIKOMI; TUOHIMAA *et al.*, 1993), reforçando, portanto, que a T poderia ter função diferente entre as glândulas. O tratamento com CM também aumentou a massa absoluta e a massa relativa da SM em relação ao grupo SHAM. Embora bem caracterizada em modelo animal a capacidade do CM em reduzir a massa corporal quando administrada em altas concentrações (ARCARI; BARTCHEWSKY; DOS SANTOS; OLIVEIRA *et al.*, 2009; BORGES; SILVA; LOZANO; MISSASSI *et al.*, 2020), sua capacidade de alterar a massa de órgãos ainda não foi descrita. Apesar disso, um estudo demonstrou o potencial da CM em promover a reparação tecidual, como observado por meio do aumento ósseo alveolar após exodontia em ratos (BRASILINO; STRINGHETTA-GARCIA; PEREIRA; PEREIRA *et al.*, 2018). Embora este estudo seja o primeiro a mostrar o efeito da CM na massa das glândulas salivares, esse efeito não é exclusivo desse produto natural, já que o extrato

aquoso da erva *Ephedrae* também demonstrou ser capaz de aumentar a massa das glândulas salivares (HAN; HUH; HAN; KANG *et al.*, 2018).

A CTS é um fator essencial na manutenção da homeostase da saúde bucal, sendo constituída por fosfato inorgânico, ácido carbônico/bicarbonato, e um sistema de tamponante de proteínas que é responsável pela manutenção apropriada do balanço ácido-base. (KIVELA; PARKKILA; PARKKILA; LEINONEN *et al.*, 1999; LAMANDA; CHEAIB; TURGUT; LUSSI, 2007). Contudo, o fosfato possui uma menor contribuição a CTS total em relação ao bicarbonato (LILIENTHAL, 1955), sendo provável que o mesmo tenha importância como sistema tampão apenas durante a salivação não-estimulada (LAGERLOF; OLIVEBY; WEETMAN; GEDDES, 1994). Portanto, o aumento da CTS no grupo OQX comparado ao SHAM pode estar associado com o aumento da TFS, fosfato inorgânico e o sistema tamponante ácido carbônico/bicarbonato, sendo que apenas a concentração de PT foi menor no grupo OQX. A regulação por andrógenos e tecido específica do gene da anidrase carbônica (HARKONEN; MAKELA; VALVE; KARHUKORPI *et al.*, 1991; JEFFERY; CARTER; WILSON, 1984; KAUNISTO; FLEMING; KNEER; SLY *et al.*, 1999) e particularmente, o aumento da atividade de anidrase carbônica nos rins de ratos castrados reforçam a hipótese (REFERÊNCIA SUZUKI).

A função da glândula PA está intimamente relacionada à síntese e liberação de proteínas na saliva, como a AMI, sendo que a análise de sua atividade é utilizada como indicador da função glandular (VEDAM; BOAZ; NATARAJAN; GANAPATHY, 2017). Sabe-se que a OQX altera a via de sinalização do receptor de membrana beta-adrenérgico da PA, responsável pela produção e liberação de AMI (BUSCH; BORDA, 2003; BUSCH; STERIN-BORDA; BORDA, 2006), além de regular a expressão de várias proteínas, enzimas e fatores de crescimento nas glândulas salivares (ROSINSKI-CHUPIN; ROUGEON, 1990). Os menores níveis de PT e AMI aqui apresentados indicam hipofunção da glândula, parâmetros que foram restabelecidos após a TRT, conforme observado também em experimento *ex vivo* (BUSCH; BORDA, 2003). O tratamento com CM também restaurou o nível de atividade de AMI, assim como encontrado em ratos diabéticos após o tratamento com *Ixeridium dentatum* (BHATTARAI; LEE; KIM; KIM *et al.*, 2018). Esse efeito pode ser atribuído à ação antioxidante dos compostos do CM, que restauraram parcialmente a função do PA. Também é importante observar que não há associação entre UT e CM.

O processo de produção de saliva pode ser dividido em dois estágios. No primeiro estágio, após a estimulação nervosa, as células acinares secretam a saliva primária isotônico em relação ao fluido intersticial e que contém amilase, mucinas, eletrólitos e fluido extracelular (ILEA; ANDREI; FEURDEAN; BABTAN *et al.*, 2019; MACLAREN; SNEYD; CRAMPIN, 2012; PROCTOR, 2016). Nas glândulas salivares, as células acinares secretam a maior parte do líquido na saliva que é impulsionado pela secreção ativa de cloreto e contém altas concentrações de sódio e cloreto (LEE; OHANA; PARK; YANG *et al.*, 2012). Este fluido enriquecido em cloreto de sódio cria gradiente osmótica que direciona o transporte de água para o lúmen dos ácinos via transporte paracelular e também principalmente pela via transcelular por meio da aquaporina expressa na membrana apical das células acinares (KAWEDIA; NIEMAN; BOIVIN; MELVIN *et al.*, 2007). A saliva primária também apresenta em sua composição íons cálcio e fosfato que são secretadas à custa de proteínas transportadoras expressas nas membranas basolaterais e luminas nas células acinares (HOMANN; KINNE-SAFFRAN; ARNOLD; GAENGLER *et al.*, 2006; HOMANN; ROSIN-STEINER; STRATMANN; ARNOLD *et al.*, 2005). No segundo estágio, a saliva primária é modificada à medida que passa pelos sistemas de ductos que apresentam baixa permeabilidade à água e por isso apresentam função secretora mínima de fluídos (SNEYD; CRAMPIN; YULE, 2014). O sódio e fosfato são reabsorvidos ativamente, o potássio é secretado ativamente, o cloreto é absorvido passivamente e o bicarbonato é secretado (HOMANN; ROSIN-STEINER; STRATMANN; ARNOLD *et al.*, 2005; LEE; OHANA; PARK; YANG *et al.*, 2012). Essas modificações, levam a saliva secundária, secretada na cavidade bucal à se tornar hipotônica em relação as células (SNEYD; CRAMPIN; YULE, 2014).

No presente estudo, a OQX aumentou TFS o que pode ser associado com as maiores concentrações salivares dos íons cálcio e cloreto, este último em especial pela função essencial em controlar o fluxo de água durante a secreção salivar. Tais alterações podem ser associadas basicamente com o componente hormonal, uma vez que nos animais tratados com CM nenhum efeito significativo foi observado. Em contrapartida, a TRT restabeleceu os parâmetros próximos aos valores do grupo SHAM. Tais resultados nos apontam a perspectiva que a utilidade e efetividade dos extratos naturais no tratamento das disfunções das glândulas salivares pode ser relacionado com o tipo de modelo experimental, uma vez que o extrato de *Ixeris dentata* e *Dendrobium candidum* foram efetivos em restabelecer a secreção salivar

em nas disfunções induzidas pelo diabetes (BHATTARAI; LEE; KIM; KIM *et al.*, 2018) e Síndrome de Sjögren (XIAO; NG; FENG; YAO *et al.*, 2011), respectivamente.

Os efeitos da OQX no fluxo e composição salivar podem ser associados, pelo menos em parte, as alterações decorrentes no sistema de ductos em função da castração, como bem evidenciado nas glândulas parótidas a significativa redução do sistema de ácinos e ductos, em especial os ductos intercalares (JEZEK; BANEK; BANEK, 1996), como também a extensa involução das células dos TGCs devido à conversão do fenótipo em células do ducto estriado nas glândulas submandibulares de roedores (ADTHAPANYAWANICH; KUMCHANTUEK; NAKATA; YAMAMOTO *et al.*, 2015). Além do mais, por meio de pesquisas sobre os efeitos da T na fisiologia renal, constatou-se a capacidade desse hormônio em modular a excreção e reabsorção de eletrólitos por mecanismos dependentes do receptor de andrógeno e expressão de proteínas de ligação e transporte. Por exemplo, em ratos castrados ocorre aumento da excreção urinária de sódio e potássio, o que foi revertido pela TRT (TOOT; JENKINS; DUNPHY; BOEHME *et al.*, 2008). Em contrapartida, a orquiectomia em roedores também reduziu a excreção de cálcio urinário, enquanto a TRT restabeleceu a excreção desse eletrólito ao nível do grupo SHAM (HSU; DIMKE; SCHOEBER; HSU *et al.*, 2010). Por sua vez, os efeitos dos andrógenos na excreção renal de fosfato ainda não são claros, apesar de dados clínicos indicarem que a T reduz a reabsorção renal de fosfato em humanos, enquanto em ratos parece não ter efeito (KHALIL; KIM; JARDI; VANDERSCHUEREN *et al.*, 2018). Apesar das similaridades na expressão das proteínas transportadoras de eletrólitos entre rins e glândulas salivares (ROUSSA, 2011), pesquisas deverão ser direcionadas para estudar quais os mecanismos moleculares envolvidos na sinalização androgênica que estão envolvidos nas mudanças da excreção de cálcio e cloreto pelas glândulas salivares.

A ação da T no estado redox é amplamente estudada na literatura científica, apresentando tanto efeitos antioxidantes como pró-oxidantes, dependendo do tecido analisado (PROCTOR, 2016; SHOIEB; ESMAT; KHALIFA; ABDEL-NAIM, 2018; TOSTES; CARNEIRO; CARVALHO; RECKELHOFF, 2016; WU; GU; LI, 2017). A TRT administrada via injeção subcutânea em coelhos e ratos normais gera espécies reativas de oxigênio nos testículos (AYDILEK; AKSAKAL; KARAKILCIK, 2004; CHAINY; SAMANTARAY; SAMANTA, 1997), enquanto outros trabalhos mostram que a TRT administrada via implantes subcutâneos de T em ratos castrados possui efeito

antioxidante na próstata (TAM; GAO; LEUNG; HO, 2003), no miocárdio (ELEAWA; SAKR; HUSSEIN; ASSIRI *et al.*, 2013) e tecido nervoso (CHAINY; SAHOO, 2020). Além disso, a TRT eleva os níveis de PC e TBARS no plasma (DEYHIM; PATIL; VILLARREAL; LOPEZ *et al.*, 2007) e no cérebro (WANG; LIU; ZHANG; CHEN *et al.*, 2019).

No presente estudo, o grupo OQX apresentou aumento do dano oxidativo aos lipídios salivares, conforme demonstrado pelos níveis de TBARS salivar, da mesma forma que encontrado no plasma de ratos castrados (DEYHIM; PATIL; VILLARREAL; LOPEZ *et al.*, 2007), além disso, o tratamento com CM reduziu o dano oxidativo aos lipídios na saliva, semelhante ao efeito observado no plasma de ratos tratados com CM após extração dentária (BRASILINO; STRINGHETTA-GARCIA; PEREIRA; PEREIRA *et al.*, 2018), efeito gerado pelas características antioxidantes da CM. Entretanto, a associação de UT+CM mostrou-se ainda mais eficiente em reduzir o TBARS salivar. A otimização desse efeito pode ser justificada tendo-se em vista que os níveis normais de T são essenciais para manutenção do estado antioxidante de forma tecido específico (TOSTES; CARNEIRO; CARVALHO; RECKELHOFF, 2016), em adição com o efeito antioxidante inerente do CM. Por sua vez, o dano oxidativo às proteínas salivares aumentou nos animais OQX, como também observado nos testículos de ratos obesos e castrados (ATILGAN; PARLAKTAS; ULUOCAK; ERDEMIR *et al.*, 2013), tendo os tratamentos UT e UT+CM normalizado o dano às proteínas. Embora a ausência de T tenha gerado níveis mais elevados dos marcadores de estresse oxidativo, houve também um maior nível da CAT, sugerindo um efeito compensatório (ABOU-KHALIL; ALI; ALI; IBRAHIM, 2020). Os resultados abrangentes mostram que o dano oxidativo aumentou em animais com deficiência de T, com a TRT sendo eficiente em diminuir o dano às proteínas e o CM em reduzir os danos aos lipídeos. Já a associação de ambos os tratamentos UT+CM reverteu o quadro de estresse oxidativo ocasionado pela castração.

5 CONCLUSÃO

Concluimos que a orquiectomia altera a qualidade e composição salivar em ratos Wistar, o que pode estar associado, pelo menos em parte, ao aumento do estresse oxidativo. As implicações dessas mudanças na homeostase da saúde bucal devem ser estudadas em experimentos futuros. A TRT com UT de longa duração restaurou os parâmetros bioquímicos, funcionais e redox da saliva em ratos orquiectomizados. O CM não teve um efeito semelhante ao da T na função da glândula salivar, no entanto, pode ser considerado uma ferramenta para amenizar o estresse oxidativo salivar induzido por orquiectomia.

REFERÊNCIAS

- ABOU-KHALIL, N. S.; ALI, M. F.; ALI, M. M.; IBRAHIM, A. Surgical castration versus chemical castration in donkeys: response of stress, lipid profile and redox potential biomarkers. **BMC Vet Res**, 16, n. 1, p. 310, Aug 26 2020.
- 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.
- ADTHAPANYAWANICH, K.; YAMAMOTO, M.; WAKAYAMA, T.; NAKATA, H. *et al.* Expression and localization of receptor protein tyrosine phosphatase beta and its ligand pleiotrophin in the submandibular gland of mice. **Arch Oral Biol**, 58, n. 2, p. 181-191, Feb 2013.
- AKANNI, O. O.; ABIOLA, O. J.; ADARAMOYE, O. A. Methyl Jasmonate Ameliorates Testosterone Propionate-induced Prostatic Hyperplasia in Castrated Wistar Rats. **Phytother Res**, 31, n. 4, p. 647-656, Apr 2017.
- ARCARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A. *et al.* Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, 17, n. 12, p. 2127-2133, Dec 2009.
- ARCARI, D. P.; SANTOS, J. C.; GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food Chem**, 141, n. 2, p. 809-815, Nov 15 2013.
- ASARIAN, L.; GEARY, N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 361, n. 1471, p. 1251-1263, Jul 29 2006.
- ASARIAN, L.; GEARY, N. Sex differences in the physiology of eating. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 305, n. 11, p. R1215-1267, Dec 2013.
- ATILGAN, D.; PARLAKTAS, B. S.; ULUOCAK, N.; ERDEMIR, F. *et al.* Weight loss and melatonin reduce obesity-induced oxidative damage in rat testis. **Adv Urol**, 2013, p. 836121, 2013.
- 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.
- AYDILEK, N.; AKSAKAL, M.; KARAKILCIK, A. Z. Effects of testosterone and vitamin E on the antioxidant system in rabbit testis. **Andrologia**, 36, n. 5, p. 277-281, Oct 2004.
- 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 15 1996.
- BHATTARAI, K. R.; LEE, H. Y.; KIM, S. H.; KIM, H. R. *et al.* *Ilex dentata* Extract Increases Salivary Secretion through the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress in a Diabetes-Induced Xerostomia Rat Model. **Int J Mol Sci**, 19, n. 4, Apr 2 2018.
- BIGAGLI, E.; LODOVICI, M. Circulating Oxidative Stress Biomarkers in Clinical Studies on Type 2 Diabetes and Its Complications. **Oxid Med Cell Longev**, 2019, p. 5953685, 2019.

BORGES, C. S.; SILVA, P. V.; LOZANO, A. F. Q.; MISSASSI, G. *et al.* Impact of timing of the anorexigen sibutramine administration on reproductive end-points of male rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 127, n. 6, p. 525-532, Dec 2020.

BRASILINO, M. D. S.; STRINGHETTA-GARCIA, C. T.; PEREIRA, C. S.; PEREIRA, A. A. F. *et al.* Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves bone formation in the alveolar socket healing after tooth extraction in rats. **Clin Oral Investig**, 22, n. 3, p. 1449-1461, Apr 2018.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. *In*: FLEISCHER, S. e PACKER, L. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, 1978. v. 52, p. 302-310.

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 2003.

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, 2006.

CALLIES, F.; KOLLENKIRCHEN, U.; VON ZUR MUHLEN, C.; TOMASZEWSKI, M. *et al.* Testosterone undecanoate: a useful tool for testosterone administration in rats. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, 111, n. 4, p. 203-208, Jun 2003.

CEFALU, W. T.; PARDRIDGE, W. M.; CHAUDHURI, G.; JUDD, H. L. Serum bioavailability and tissue metabolism of testosterone and estradiol in rat salivary gland. **J Clin Endocrinol Metab**, 63, n. 1, p. 20-28, Jul 1986.

CHAINY, G. B.; SAMANTARAY, S.; SAMANTA, L. Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. **Andrologia**, 29, n. 6, p. 343-349, Nov-Dec 1997.

CHAINY, G. B. N.; SAHOO, D. K. Hormones and oxidative stress: an overview. **Free Radic Res**, 54, n. 1, p. 1-26, Jan 2020.

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.

CHEN, J.; XIONG, C. M.; SONG, S. S.; HAN, P. *et al.* Fraction of macroporous resin from *Smilax china* L. inhibits testosterone propionate-induced prostatic hyperplasia in castrated rats. **J Med Food**, 15, n. 7, p. 646-650, Jul 2012.

CHRISTOU, M. A.; CHRISTOU, P. A.; MARKOZANNES, G.; TSATSOULIS, A. *et al.* Effects of Anabolic Androgenic Steroids on the Reproductive System of Athletes and Recreational Users: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports Med**, 47, n. 9, p. 1869-1883, Sep 2017.

CONFORTI, A. S.; GALLO, M. E.; SARAVI, F. D. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. **Bone**, 50, n. 1, p. 9-13, Jan 2012.

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. M.; SAMPAIO, G. R.; PINTO, C. B.; CATHARINO, R. R. *et al.* Bioavailability of chlorogenic acids in rats after acute ingestion of mate tea (*Ilex paraguariensis*) or 5-caffeoylquinic acid. **Eur J Nutr**, 56, n. 8, p. 2541-2556, Dec 2017.

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.

ELEAWA, S. M.; SAKR, H. F.; HUSSEIN, A. M.; ASSIRI, A. S. *et al.* Effect of testosterone replacement therapy on cardiac performance and oxidative stress in orchidectomized rats. **Acta Physiol (Oxf)**, 209, n. 2, p. 136-147, Oct 2013.

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.

FELIX-PATRICIO, B.; MIRANDA, A. F.; MEDEIROS, J. L., Jr.; GALLO, C. B. M. *et al.* The prostate after castration and hormone replacement in a rat model: structural and ultrastructural analysis. **Int Braz J Urol**, 43, n. 5, p. 957-965, Sep-Oct 2017.

GAN, R. Y.; ZHANG, D.; WANG, M.; CORKE, H. Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus *Ilex*, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. **Nutrients**, 10, n. 11, Nov 5 2018.

GU, L.; XIONG, W. T.; ZHUANG, Y. L.; ZHANG, J. S. *et al.* Effects of *Cistanche deserticola* extract on penis erectile response in castrated rats. **Pak J Pharm Sci**, 29, n. 2, p. 557-562, Mar 2016.

HAN, H. Y.; HUH, J. I.; HAN, S. R.; KANG, M. G. *et al.* Assessing the safety of an *Ephedrae Herba* aqueous extract in rats: A repeat dose toxicity study. **Regul Toxicol Pharmacol**, 94, p. 144-151, Apr 2018.

HARKONEN, P. L.; MAKELA, S. I.; VALVE, E. M.; KARHUKORPI, E. K. *et al.* Differential regulation of carbonic anhydrase II by androgen and estrogen in dorsal and lateral prostate of the rat. **Endocrinology**, 128, n. 6, p. 3219-3227, Jun 1991.

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.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **J Food Sci**, 72, n. 9, p. R138-151, Nov 2007.

HOMANN, V.; KINNE-SAFFRAN, E.; ARNOLD, W. H.; GAENGLER, P. *et al.* Calcium transport in human salivary glands: a proposed model of calcium secretion into saliva. **Histochem Cell Biol**, 125, n. 5, p. 583-591, May 2006.

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.

HSU, Y. J.; DIMKE, H.; SCHOEBER, J. P.; HSU, S. C. *et al.* Testosterone increases urinary calcium excretion and inhibits expression of renal calcium transport proteins. **Kidney Int**, 77, n. 7, p. 601-608, Apr 2010.

HUH, J. S.; CHUNG, B. H.; HONG, C. H.; RYU, J. K. *et al.* The effects of testosterone replacement on penile structure and erectile function after long-term castration in adult male rats. **Int J Impot Res**, 30, n. 3, p. 122-128, Jun 2018.

ILEA, A.; ANDREI, V.; FEURDEAN, C. N.; BAPTAN, 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.

JAYUSMAN, P. A.; MOHAMED, I. N.; ALIAS, E.; DOM, S. M. *et al.* Effects of standardized quassinoid-rich Eurycoma longifolia extract in a rat model of osteoporosis due to testosterone deficiency: A densitometric, morphometric and biomechanical study. **J Xray Sci Technol**, 26, n. 4, p. 643-656, 2018.

JEFFERY, S.; CARTER, N. D.; WILSON, C. Carbonic anhydrase II isoenzyme in rat liver is under hormonal control. **Biochem J**, 221, n. 3, p. 927-929, Aug 1 1984.

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

KAUNISTO, K.; FLEMING, R. E.; KNEER, J.; SLY, W. S. *et al.* Regional expression and androgen regulation of carbonic anhydrase IV and II in the adult rat epididymis. **Biol Reprod**, 61, n. 6, p. 1521-1526, Dec 1999.

KAWEDIA, J. D.; NIEMAN, M. L.; BOIVIN, G. P.; MELVIN, J. E. *et al.* Interaction between transcellular and paracellular water transport pathways through Aquaporin 5 and the tight junction complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 9, p. 3621-3626, Feb 27 2007.

KHALIL, R.; KIM, N. R.; JARDI, F.; VANDERSCHUEREN, D. *et al.* Sex steroids and the kidney: role in renal calcium and phosphate handling. **Mol Cell Endocrinol**, 465, p. 61-72, Apr 15 2018.

KIVELA, J.; PARKKILA, S.; PARKKILA, A. K.; LEINONEN, J. *et al.* Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. **J Physiol**, 520 Pt 2, p. 315-320, Oct 15 1999.

KWONG, J. C. C.; KRAKOWSKY, Y.; GROBER, E. Testosterone Deficiency: A Review and Comparison of Current Guidelines. **J Sex Med**, 16, n. 6, p. 812-820, Jun 2019.

LAGERLOF, F.; OLIVEBY, A.; WEETMAN, D. A.; GEDDES, D. A. Intra- and inter-individual differences in salivary sucrose clearance over time. **Caries Res**, 28, n. 5, p. 348-352, 1994.

LAINE, M.; BLAUER, M.; YLIKOMI, T.; TUOHIMAA, P. *et al.* Immunohistochemical demonstration of androgen receptors in human salivary glands. **Arch Oral Biol**, 38, n. 4, p. 299-302, Apr 1993.

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 28 2007.

LEE, G.; SHIN, J.; CHOI, H.; JO, A. *et al.* Cynanchum wilfordii Ameliorates Testosterone-Induced Benign Prostatic Hyperplasia by Regulating 5alpha-Reductase and Androgen Receptor Activities in a Rat Model. **Nutrients**, 9, n. 10, Sep 27 2017.

LEE, M. G.; OHANA, E.; PARK, H. W.; YANG, D. *et al.* Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO₃ secretion. **Physiol Rev**, 92, n. 1, p. 39-74, Jan 2012.

LEE, M. Y.; SHIN, I. S.; SEO, C. S.; LEE, N. H. *et al.* Effects of Melandrium firmum methanolic extract on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in Wistar rats. **Asian J Androl**, 14, n. 2, p. 320-324, Mar 2012.

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.

LILIENTHAL, B. An analysis of the buffer systems in saliva. **J Dent Res**, 34, n. 4, p. 516-530, Aug 1955.

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.

MACLAREN, O. J.; SNEYD, J.; CRAMPIN, E. J. Efficiency of primary saliva secretion: an analysis of parameter dependence in dynamic single-cell and acinus models, with application to aquaporin knockout studies. **J Membr Biol**, 245, n. 1, p. 29-50, Jan 2012.

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.

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 1 2014.

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.

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.

PENG, Q. H.; YAO, X. L.; WU, Q. L.; TAN, H. Y. *et al.* Effects of eye drops of Buddleja officinalis Maxim. extract on lacrimal gland cell apoptosis in castrated rats with dry eye. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**, 8, n. 3, p. 244-249, Mar 2010.

PEREIRA, A. A. F.; TIRAPELI, K. G.; CHAVES-NETO, A. H.; DA SILVA BRASILINO, M. *et al.* Ilex paraguariensis supplementation may be an effective nutritional approach to modulate oxidative stress during perimenopause. **Exp Gerontol**, 90, p. 14-18, Apr 2017.

PEREIRA, C. S.; STRINGHETTA-GARCIA, C. T.; DA SILVA XAVIER, L.; TIRAPELI, K. G. *et al.* Ilex paraguariensis decreases oxidative stress in bone and mitigates the damage in rats during perimenopause. **Exp Gerontol**, 98, p. 148-152, Nov 2017.

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.; MITSIADIS, T. A. Physiology, Pathology and Regeneration of Salivary Glands. **Cells**, 8, n. 9, Aug 26 2019.

PROCTOR, G. B. The physiology of salivary secretion. **Periodontol** 2000, 70, n. 1, p. 11-25, Feb 2016.

ROSINSKI-CHUPIN, I.; ROUGEON, F. A new member of the glutamine-rich protein gene family is characterized by the absence of internal repeats and the androgen control of its expression in the submandibular gland of rats. **J Biol Chem**, 265, n. 18, p. 10709-10713, Jun 25 1990.

ROUSSA, E. Channels and transporters in salivary glands. **Cell Tissue Res**, 343, n. 2, p. 263-287, Feb 2011.

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.

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.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *In: Methods in Enzymology*: Academic Press, 1999. v. 299, p. 152-178.

SNEYD, J.; CRAMPIN, E.; YULE, D. Multiscale modelling of saliva secretion. **Math Biosci**, 257, p. 69-79, Nov 2014.

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.

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.

TEK, M.; BALLI, E.; CIMEN, B.; EFESOY, 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.

TILBURT, J. C.; KAPTCHUK, T. J. Herbal medicine research and global health: an ethical analysis. **Bull World Health Organ**, 86, n. 8, p. 594-599, Aug 2008.

TOOT, J.; JENKINS, C.; DUNPHY, G.; BOEHME, S. *et al.* Testosterone influences renal electrolyte excretion in SHR/y and WKY males. **BMC Physiol**, 8, p. 5, Mar 26 2008.

TORRES, T.; FARAH, A. Coffee, mate, acai and beans are the main contributors to the antioxidant capacity of Brazilian's diet. **Eur J Nutr**, 56, n. 4, p. 1523-1533, Jun 2017.

TOSTES, R. C.; CARNEIRO, F. S.; CARVALHO, M. H.; RECKELHOFF, J. F. Reactive oxygen species: players in the cardiovascular effects of testosterone. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 310, n. 1, p. R1-14, Jan 1 2016.

TYAGI, V.; SCORDO, M.; YOON, R. S.; LIPORACE, F. A. *et al.* Revisiting the role of testosterone: Are we missing something? **Rev Urol**, 19, n. 1, p. 16-24, 2017.

VEDAM, V. K. V.; BOAZ, K.; NATARAJAN, S.; GANAPATHY, S. Salivary Amylase as a Marker of Salivary Gland Function in Patients Undergoing Radiotherapy for Oral Cancer. **J Clin Lab Anal**, 31, n. 3, May 2017.

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 9 2019.

WANG, X. J.; XU, T. Y.; XIA, L. L.; ZHONG, S. *et al.* Castration impairs erectile organ structure and function by inhibiting autophagy and promoting apoptosis of corpus cavernosum smooth muscle cells in rats. **Int Urol Nephrol**, 47, n. 7, p. 1105-1115, Jul 2015.

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.

XIAO, L.; NG, T. B.; FENG, Y. B.; YAO, T. *et al.* Dendrobium candidum extract increases the expression of aquaporin-5 in labial glands from patients with Sjogren's syndrome. **Phytomedicine**, 18, n. 2-3, p. 194-198, Jan 15 2011.

ZAMANSOLTANI, F.; NASSIRI-ASL, M.; SAROOKHANI, M. R.; JAHANI-HASHEMI, H. *et al.* Antiandrogenic activities of Glycyrrhiza glabra in male rats. **Int J Androl**, 32, n. 4, p. 417-422, Aug 2009.

ANEXO A – CERTIFICADO DE 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 "Análise do estresse oxidativo e histomorfometria das glândulas salivares após tratamento com chá-mate (CM) (*Llex paraguariensis*) e undecanoato de testosterona (UT) em ratos Wistar orquiectomizados (OQX) e suas implicações no fluxo e composição bioquímica da saliva", Processo FOA nº 00455-2019, 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 30 de Julho de 2019.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 30 de Março de 2021.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Abril de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Analysis of oxidative stress and histomorphometry of salivary glands after mate tea (*Llex paraguariensis*) and testosterone undecanoate in Wistar rats orchidectomized and their implactiona in the salivary flow rate and saliva biochemistry composition", Protocol FOA nº 00455-2019, 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 July 30, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 30, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 30, 2021.

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

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Aracatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3606-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B – COMPROVANTE DE CADASTRO NO SISGEN



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AD6CD28

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AD6CD28**
 Usuário: **UNESP**
 CPF/CNPJ: **48.031.918/0001-24**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Ilex paraguariensis
Chá mate comercial na forma solúvel da marca Leão, Paraná. Brasil

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Análise do estresse oxidativo e histomorfometria das glândulas salivares após tratamento com chá-mate (Ilex paraguariensis) e undecanoato de testosterona em ratos Wistar orquiectomizados e suas implicações no fluxo e composição bioquímica da saliva.**

Equipe

Antonio Hernandes Chaves Neto	UNESP
Matheus Lima Cypriano	UNESP
Guilherme Henrique Alves dos Santos Ramos	UNESP
Ana Carolina Fujimori de Oliveira	UNESP

Ana Claudia de Melo Stevanato Nakamune

UNESP

Data do Cadastro: **29/08/2019 13:16:48**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **13:17 de 29/08/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**